

Verfahren zur Herstellung von lagerstabilen multiplen Emulsionen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer stabilen multiplen Emulsion vom Typ Wasser/Öl/Wasser (WOW), wobei die äußere, sowie die innere wässrige Phase einen pharmazeutischen Wirkstoff enthalten kann, und deren ölhaltige Phase ein nicht-ionisches Tensid enthält, das als Emulgator wirkt. Hergestellt wird diese multiple Emulsion durch das Einbringen der wässrigen Phase durch eine poröse Membran in die Ölphase und anschließende Abkühlung der Wasser-in-Öl (W/O) Emulsion zur Bildung der oben genannten W/O/W Doppel-
5 emulsion, die insbesondere für veterinärmedizinische Zwecke eingesetzt wird.

Multiple Emulsionen sind Emulsionen von Emulsionen, die vornehmlich in zwei Arten vorliegen können, nämlich als W/O/W sowie als O/W/O-Emulsionen. Diese Systeme sind in vielen Anwendungsbereichen von großem Interesse. Sie erlauben zum einen den Schutz der Wirksubstanzen in der innersten Phase, zum anderen das Einbringen von zwei miteinander reagierenden Wirksubstanzen in zwei Phasen der selben Formulierung. Außerdem kann eine verlängerte Wirksamkeit der Wirkstoffe in der innersten Phase nach Verabreichung an Organismen beobachtet werden.
10

Heutzutage gibt es allerdings nur wenige multiple Emulsionen in Medizin und Kosmetik, da ihre Formulierung und ihre Stabilität immer noch ein Problem darstellen und die Phänomene der Emulsifikation immer noch nicht ganz aufgeklärt sind. Grundlagen sind dargestellt in „Multiple W/O/W emulsions, theoretical study“ Terrisse, I.; M. Seiller, et al. (1992). Congr. Int. Technol. Pharm., 6th
15 4: 328-35.

In der Veterinärmedizin werden Impfstoffe zur Immunisierung gegen einen oder mehrere Krankheitserreger benötigt, bei denen der Wirkstoff möglichst fein verteilt im Impfstoff vorliegt und sich insbesondere über einen verlängerten Zeitraum im Tier ausbreitet.
20

Multiple Emulsionen stellen ein interessantes Emulsionssystem für die Verwendung in der Impfstoffformulierung dar. Sie sind Emulsionen, die in der innersten Phase kleinere Tropfen einer Flüssigkeit enthalten, die der kontinuierlichen äußersten Phase entspricht. Eine Möglichkeit der Formulierung eines solchen Impfstoffes ist die multiple W/O/W Emulsion. Dabei befindet sich z.B. der Wirkstoff in Form eines nicht löslichen Proteins einer bestimmten Partikelgröße in der wässrigen innersten Phase. Durch die zusätzliche Ölphase wird die Aufnahme in den Körper verzögert, und somit die Wirksamkeit verlängert. Außerdem wirkt das Öl, gegebenenfalls als Adjuvans, d.h. es kann die antigene Wirkung des Impfstoffs verstärken.
25
30

Bekannt ist die Formulierung in Form von multiplen Emulsionen auch aus dem Bereich der Kosmetik. In der Offenlegungsschrift DE 196 30 176 A1 sind die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe sowie die Herstellung solcher Doppelemulsionen mit Hilfe der Phaseninversion beschrieben.

Die Patentschrift US-6 251 407 B1 beschreibt eine Zusammensetzung an Öl, Emulgator, wässriger Phase und pharmazeutischem Wirkstoff, die zur Herstellung eines Impfstoffes herangezogen werden kann. Darin können die einzelnen Bestandteile, wie folgt, näher beschrieben werden: Bei dem verwendeten Öl handelt es sich um ein sogenanntes selbst-emulgierendes Öl, das aus polyglycolisierten Glyceriden besteht. Die wässrige Phase enthält einen Wirkstoff, bei dem es sich um ein Antigen handelt.

10 Diese Doppelemulsion gemäß EP-A-489 181 oder EP-A-481 982 wird durch das „Einrühren“ der wässrigen wirkstoffhaltigen in eine ölige Phase und anschließende Phaseninversion zur Bildung einer Doppelemulsion durch Temperaturgradienten und anschließendes Homogenisieren durch Rühren hergestellt.

15 Der Nachteil der W/O/W-Emulsion, der sich hier wie im oben genannten Fall ergibt, ist die inhomogene, breite Tröpfchenverteilung und die schlechte Reproduzierbarkeit der Tröpfchenverteilung in der fertigen Emulsion bei unterschiedlichen Rührkesselgeometrien. Des weiteren ist dieses Verfahren nur in diskontinuierlichen Betrieb möglich.

Außerdem sind Verfahren, multiple Emulsionen mit Membranen zu erzeugen, bereits bekannt. Die Literaturstelle Joscelyne, S. M. and G. Tragardh (2000). „Membrane emulsification – a literature review“. J. Membr. Sci 169 (1): 107-117 beschreibt diese ausführlich. Dabei wird eine z.B. wässrige Phase in eine der Phasen über eine Membran eingebracht. Die Tröpfchengröße entspricht dem 2 bis 10fachen des Porendurchmessers der Membran. Einschränkungen ergeben sich aus der Limitierung der Tröpfchengröße durch den Radius der Membranpore. Es wurde jedoch festgestellt, dass sich der Durchmesser der Membranpore nachteilig auf die Einbringung eines Wirkstoffes in die
25 Emulsion auswirkt, wenn der Wirkstoffpartikel zu groß ist.

Die Patentanmeldung EP 564 738 A1 ein Membranverfahren zur Herstellung von Emulsionen, bei dem eine erste Emulsion durch Membranemulsifikation, die Erzeugung der Doppelemulsion durch Rühren, oder beide durch Membranemulsifikation bewirkt werden. Das Verfahren dient dazu, durch Schritte einen fettarmen Brotaufstrich in Form einer Doppelemulsion herzustellen, die sich
30 durch Einsparung von Stabilisatoren und Gelbildnern auszeichnet. Die endgültigen Emulsionstropfen haben dort einen mittleren Durchmesser von 10 bis 16 µm.

Alle genannten Verfahren sind nur auf einen Anwendungsbereich zugeschnitten und können deshalb nicht einfach auf weitere Nutzungsgebiete übertragen werden.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, eine stabile Doppelemulsion des Typs 1) W/O/W zu bilden, wobei die äußere und/oder die innere wässrige Phase einen pharmazeutischen Wirkstoff
5 z.B. in Form eines Antigens enthält, und deren öhlaltige Phase ein Tensid enthält, das als Emulgator wirkt.

Die Tröpfchengröße der Ölphase sollte dabei insbesondere den mittleren Durchmesser von $3\mu\text{m}$, die der inneren wässrigen Phase von $0,3\mu\text{m}$ nicht überschreiten. Das Verfahren soll zudem insbesondere eine engere Tröpfchengrößenverteilung und damit verbunden eine höhere Reproduzier-
10 barkeit als herkömmliche Verfahren aufweisen.

Außerdem ergibt sich das Problem, dass die heterogen und teilweise agglomeriert vorliegenden Wirkstoffpartikel nicht auf Grund ihrer Größe z.B. durch die verwendete Membran getrennt oder durch Scherung zerstört werden.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, und darin liegt die Lösung der Aufgabe begründet, dass
15 die oben genannten, lagerstabilen multiplen Emulsionen vom Typ W/O/W durch folgendes Verfahren, das Gegenstand der Erfindung ist, gebildet werden können:

- a) Einrühren des Wirkstoffs in eine wässrige Phase,
- b) Emulgieren der wässrigen Phase durch Einleiten der wässrigen Phase durch eine grobporige, poröse Membran in eine Ölphase,
- 20 c) Phaseninversion der Emulsion aus b), durch Abkühlen der Mischung bei einer Kühlrate von mindestens $0,3\text{ K/min}$, bevorzugt mindestens 1 K/min , wobei entweder der wässrigen Phase in a) oder der Ölphase in b) oder beiden Phasen ein Emulgator zugesetzt wird.

Die Bildung der einfachen Emulsion geschieht z.B. nach dem grundsätzlich bekannten Einrührverfahren. Die Tröpfchengröße (Zahlenmittel) beträgt typischerweise zwischen 10 bis $30\mu\text{m}$, die
25 besagte Phaseninversionstemperatur in der Regel 60 bis 90°C .

Für das erfindungsgemäße Verfahren werden bevorzugt poröse anorganische Membranen, besonders bevorzugt keramische Membranen, insbesondere aus Al_2O_3 , ZrO_2 , TiO_2 und Mischungen aus diesen Oxiden, besonders bevorzugt aus Al_2O_3 , eingesetzt.

Die Porengröße der Membran beträgt im Mittel bevorzugt $0,2\mu\text{m}$ bis $5\mu\text{m}$, besonders bevorzugt
30 $0,2\mu\text{m}$ bis $2\mu\text{m}$.

Als Inhaltsstoffe für die kontinuierliche Phase kommen z.B. allgemein Öle in Betracht, für die diskontinuierliche Phase z.B. wässrige Lösungen, insbesondere mit der kontinuierlichen Phase nicht mischbaren Flüssigkeiten. Bevorzugt wird als Ölphase Mineralöl, Weißöl oder pflanzliches Öl eingesetzt.

- 5 Eine weitere wesentliche Komponente ist der Emulgator, der je nach Zusammensetzung in der wässrigen a) und/oder ölhaltigen Phase b) vorgelegt wird, im bevorzugten Verfahren liegt er als nicht-ionischer Emulgator in der Ölphase b) vor.

Das Verfahren wird besonders bevorzugt in einem Temperaturbereich bzgl. der Emulsifikation nach Schritt a) von 30°C bis 35°C und bzgl. der Phaseninversion einem Temperaturgradienten von
10 30K mindestens aber von 15K durchgeführt.

Es zeigt sich, dass mit dem Verfahren durch eine entsprechende Auswahl der Einsatzstoffe und Betriebsbedingungen eine extrem enge Tröpfchengrößenverteilung und ein mittlerer Tröpfchendurchmesser (Ölphase) von 1 µm bis 3 µm erreicht werden können.

- Der in der wässrigen, also insbesondere diskontinuierlichen Phase vorgelegte Wirkstoff kann
15 beispielsweise ein pharmazeutischer Wirkstoff, bevorzugt für tiermedizinische Zwecke, insbesondere ein Antigen für eine Impfstoffformulierung sein.

Bevorzugt ist der Wirkstoff ausgewählt aus der Reihe:

- Einem Antigen, wie beispielsweise einem Virus, einem Mikroorganismus, spezieller einem Bakterium oder Parasit, oder einem Präparat bestehen, das eine Peptidkette enthält. Dieses Präparat
20 kann ein Protein oder ein Glykoprotein, besonders ein Protein oder ein Glykoprotein, das aus einem Mikroorganismus erhalten wurde, ein synthetisches Peptid oder ein Protein oder Peptide, das durch gentechnische Manipulation hergestellt wurde.

Oben genannter Virus und/oder Mikroorganismus kann vollständig inaktiviert, lebend oder abgeschwächt sein.

- 25 Als Virus, das ein Antigen darstellt, können bevorzugt genannt werden: Tollwutvirus, Aujeszký Viren, Grippeviren, der Virus der Maul-und-Klauenseuche und HIV Viren.

Als Mikroorganismus oder Bakterienart, die ein Antigen darstellen, können bevorzugt genannt werden: E.Coli und die der Stämme Pasteurella, Furunculosis, Vibriosis, Staphylococcus und Streptococcus.

Als Parasiten können bevorzugt genannt werden die der Stämme Trypanosoma, Plasmodium und Leishmania.

Die Druckdifferenz über der Membran (Transmembrandruck) beträgt bevorzugt $0,5 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ bis $25 \cdot 10^5 \text{ Pa}$, bevorzugt aber $0,5 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ bis $5 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ je nach Wirkstoffkonzentration in der diskontinuierlichen wässrigen Phase.

Das Verfahren kann grundsätzlich kontinuierlich oder in Batchfahrweise betrieben werden.

Bevorzugt wird das Verfahren in allen Schritten kontinuierlich durchgeführt.

Die Überströmung der kontinuierlichen Phase liegt bevorzugt zwischen 0,5 und 5 m/s besonders bevorzugt zwischen 1 und 3 m/s. Der Dispersphasenflux der diskontinuierlichen Phase durch die Membran beträgt insbesondere von 50 bis 1500 L/(m²*h), bevorzugt von 800 bis 1200 L/(m²*h).

Die diskontinuierliche wässrige Phase, die der Erfindung zu Grunde liegt, besteht bevorzugt aus einem Elektrolyten, der bevorzugt eine Kombination aus schwachen Säuren und schwachen Basen, schwachen Säuren und starken Basen oder starken Säuren und schwachen Basen.

Besonders bevorzugt enthalten die Elektrolyte eine oder mehrere der folgenden Verbindungen:

Borsäure, Phosphorsäure, N-2-(Acetamido)-2-aminoethansulfonsäure, N-2-(Acetamido)-2-iminodiessigsäure, Alanin, 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol, Ammoniak, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure, N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin, 2,2-Bis(hydroxyethyl)-iminotris(hydroxymethyl)methan, 2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure, 3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]propansulfonsäure, Histidin, Imidazol, Milchsäure, 2-Morpholinoethansulfonsäure, 2-Morpholinopropansulfonsäure, Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure), N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure, N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]glycin, Triethanolamin, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Zitronensäure.

Das Verfahren kann grundsätzlich steril betrieben werden.

Das Verfahren kann auch dahingehend modifiziert werden, dass mehrere verschiedene diskontinuierliche wässrige Phasen mit verschiedenen Inhaltsstoffen über mehrere unterschiedliche Membranen an verschiedenen Stellen der Ölphase zudosiert werden. Dies ist besonders vorteilhaft, wenn die einzelnen Wirkstoffe eine gegenseitige Unverträglichkeit oder Reaktivität miteinander aufweisen.

Ein vorteilhafter Nebeneffekt des Verfahrens ist die Nutzung der Membran als Emulgiermembran auf der einen und Mittel zur Filtration auf der anderen Seite, beispielsweise zur Abtrennung von

unerwünschten Agglomeraten, Verunreinigungen oder zu großen Wirkstoffpartikeln, die einen größeren Durchmesser als die Poren der Membran aufweisen und die Qualität des gewünschten Produktes beeinträchtigen können.

Die Separation von oben genannten unerwünschten NebenkompONENTEN kann in einem Verfahrensschritt realisiert werden, ebenso wie in einem mehrstufigen Verfahren.

Die Membranfiltration im Anschluss an eine Membranemulsifikation kann außerdem der Produktkonzentrierung und/oder -entsalzung dienen.

Die beschriebene Erfindung eignet sich insbesondere in der Tiergesundheit für die Formulierung von Impfstoffen nach oben beschriebenen Herstellungsverfahren, ebenso wie für die Formulierung von pharmazeutischen Wirkstoffen in der Humanmedizin, die sich durch eine günstige Darreichungsform und anpassbare „Controlled release“ Eigenschaften auszeichnen.

Die nachfolgenden Beispiele betreffen vorteilhafte erfindungsgemäße Ausführungsformen. Die Zahlenwerte bedeuten stets Gewichtsprozente, bezogen auf das Gesamtgewicht der Zubereitung, sofern nicht ausdrücklich etwas anderes angemerkt ist.

In den Figuren zeigen:

Fig. 1 Schematische Darstellung der in dem Beispiel verwendeten Versuchsanlage

Fig. 2 Schema einer mehrstufigen Anlage zur Durchführung des Verfahrens.

Beispiele**Beispiel 1**

Material:

	A.	50mM HEPES-Puffer pH 8,32	50,00 %
5	B.	Montanide ISA 206	49,95 %
	C.	Triethylamin (TEA)	0,05 %

Es wurden folgende Geräte benutzt:

- 2 Glasgefäße 1,2 zu je 2L
- Schlauchpumpe 3 Verder SF1500
- 10 HPLC Pumpe 4
- Membranmodul 5
- Membran 6 Inocermic Porengröße 1,0 μm
- 3-Wege-Ventil 7
- Schläuche, Schlauchverbindungen
- 15 Wärmetauscher 8
- Produktbehälter 9, Glasgefäß 2L

Es wurde die folgende Anlage gemäß Schema nach Fig. 1 im Labormaßstab verwendet:

- Die Ölphase 1, die das TEA enthält und die wässrige Phase 2 bestehend aus HEPES-Puffer, werden auf 33°C erhitzt. Nach Erlangen dieser Temperatur werden die beiden Phasen über eine keramische Membran 6, die sich in einem Modul genannten Gehäuse 5 befindet, mit einem Porendurchmesser von 1,0 μm miteinander in Verbindung gebracht und solange von den Pumpen 3 und 4 im Kreislauf gefördert bis die gesamte Menge an wässriger Phase mit der Ölphase vereint ist. Nach der sog. Membranemulsifikation wird die entstandene W/O Emulsion mittels eines Ventils 7 über einen Wärmetauscher 8 geleitet und dort auf 4°C abgekühlt, wobei die Phaseninversion stattfindet. Die Abkühlrate beträgt 2,5 K/min. Die entstandene multiple W/O/W Emulsion wird im Produktbehälter 9 aufgefangen.

Sie weist Tröpfchen mit einem Tropfendurchmesser von 2,3 μm auf.

Die vollständigen Versuchsparameter finden sich in Tabelle 1.

Figur 2 zeigt eine modifizierte Anlage für die Einbringung von einer Vielzahl n von Wirkstoffen.

Dabei wird eine kontinuierliche Phase 1 über eine Pumpe 3 hintereinander durch mehrere Membranmodule 5 geleitet. Diese Phase kann temperiert werden. Nach Erlangen der gewünschten Temperatur können verschiedene, ebenfalls temperierbare, diskontinuierliche Phasen 2, 7, 9, n mit verschiedenen Wirkstoffen und Elektrolyten durch die Membranen 6, 8, 10, n+1, die sich im Hinblick auf Material und Porengröße unterscheiden können, emulgiert werden. Über das Ventil 11 kann die gebildete W/O Emulsion über einen Wärmetauscher 12 geleitet und dort noch einmal temperiert werden, um eine Phaseninversion zu induzieren. Die entstandene Emulsion kann in Produktbehälter 13 aufgefangen werden.

Beispiel 2

10 Material:

A.	50mM HEPES-Puffer pH 8,32	48,50%
B.	MKS-Konzentrat (monovalent)	1,50%
C.	Montanide ISA 206	49,95%
D.	Triethylamin (TEA)	0,05%

15 Es wurden folgende Geräte benutzt:

Vgl. Beispiel 1

Membran 6 Inocermic Porengröße 1,0 µm

Die wässrige Phase bestehend aus HEPES-Puffer mit dem MKS-Konzentrat und die Ölphase, die das TEA enthält werden auf 33°C erhitzt. Bei Erreichen der 33°C werden die beiden Phasen über eine keramische Membran mit einem Porendurchmesser von 1,0 µm miteinander in Verbindung gebracht und solange im Kreislauf gefördert bis die gesamte Menge an wässriger Phase mit der Ölphase vereint ist. Die so entstandene W/O Emulsion wird über einen Wärmetauscher auf 4°C abgekühlt, wobei die Phaseninversion stattfindet. Die Kühlrate beträgt 2,5 K/min. Die entstandene multiple W/O/W Emulsion weist Tröpfchen mit einem Tropfendurchmesser von 2,0 µm auf.

25 Sonstige Versuchsparameter entsprechen Beispiel 1 und Tabelle 1.

Beispiel 3

Material:

A.	50mM HEPES-Puffer pH 8,32	45,50%
B.	MKS-Konzentrat (trivalent)	4,50%
30 C.	Montanide ISA 206	49,95%

Es wurden folgende Geräte benutzt:

Vgl. Beispiel 1

Membran 6 Inocermic Porengröße 3,0 µm

Die wässrige Phase bestehend aus HEPES-Puffer mit dem MKS-Konzentrat und die Ölphase, die
5 das TEA enthält werden auf 33°C erhitzt. Bei Erreichen von 33°C werden die beiden Phasen über
eine keramische Membran mit einem Porendurchmesser von 3 µm miteinander in Verbindung
gebracht und solange im Kreislauf gefördert bis die gesamte Menge an wässriger Phase mit der
Ölphase vereint ist. Die so entstandene W/O Emulsion wird über einen Wärmetauscher auf 4°C
abgekühlt, wobei die Phaseninversion stattfindet. Die Kühlrate beträgt 2,3 K/min. Die entstandene
10 multiple W/O/W Emulsion weist Tröpfchen mit einem Tropfendurchmesser von 2,0µm auf.

Die vollständigen Versuchsparemeter finden sich in Tabelle 1.

Beispiel 4

Material:

A.	50mM HEPES-Puffer pH 8,32	45,50%
15 B.	MKS-Konzentrat (monovalent)	4,50%
C.	Montanide ISA 206	49,95%
D.	Triethylamin (TEA)	0,05%

Es wurden folgende Geräte benutzt:

Vgl. Beispiel 1

20 Membran 6 Inocermic Porengröße 3,0 µm

Die ganze Versuchsanlage wurde zuvor dampfsterilisiert bei 121°C für 30 min, und der Versuch
unter absoluten Sterilbedingungen gefahren. Der weitere Versuchsverlauf entspricht Beispiel 3.
Die Kühlrate beträgt 1,4 K/min. Die verwendete Membran hat einen Porendurchmesser von 3 µm.
Die entstandene multiple W/O/W Emulsion weist Tröpfchen mit einem Tropfendurchmesser von
25 2,0 µm auf. Die anschließende Injektion ins Tier ergab eine Wirksamkeit von 100% bezogen auf
die Wirksamkeit des mit dem herkömmlichen Verfahren hergestellten Impfstoffs.

Die vollständigen Versuchsparemeter finden sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Versuchsparemeter der Beispiele 1 bis 4

Beispiel	Porengröße		Volumenstrom		Temperaturen		Druck
	D _p Membran µm	Membranfläche cm ³	Pumpe 1 L/min	Pumpe 2 ml/min	kontinuierliche Phase °C	nach Kühlung °C	transmembran bar
1	1,0	47	3,4	80	31,3	3,2	1,2
2	1,0	47	3,4	80	34,5	3,9	1,9
3	3,0	47	3,4	80	33,8	4,7	3,5
4	3,0	47	3,4	80	31,4	4,3	3,5

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von lagerstabilen, multiplen Emulsionen vom Typ Wasser/Öl/Wasser (W/O/W), die ein oder mehrere Wirkstoffe enthalten mit den Schritten
 - a) Einrühren des Wirkstoffs in eine wässrige Phase,
 - 5 b) Emulgieren der wässrigen Phase durch Einleiten der wässrigen Phase durch eine grobporige, poröse Membran in eine Ölphase,
 - c) Phaseninversion der Emulsion aus b), durch Abkühlen der Mischung bei einer Kühlrate von mindestens 0,3 K/min, wobei entweder der wässrigen Phase in a) oder der Ölphase in b) oder beiden Phasen ein Emulgator zugesetzt wird.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Membran poröse anorganische Membran, bevorzugt keramische Membran, besonders bevorzugt Membranen aus Aluminiumoxid, Zirkonoxid oder Titanoxid, bevorzugt aus Aluminiumoxid eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Porengröße der
15 verwendeten Membran 0,2 bis 5 µm, bevorzugt 0,3 bis 3 µm, beträgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Öl für die Ölphase ein Stoff ausgewählt aus der Reihe Mineralöl, Weißöl oder pflanzlichem Öl verwendet wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Emulgator
20 ein nichtionischer Emulgator verwendet wird, der in der Ölphase vorgelegt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Emulsifikation in Schritt a) bei einer Temperatur von 30 bis 35°C durchgeführt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Phaseninversion gemäß Schritt c) bei einer Kühlrate von mindestens 1 K/min durchgeführt wird.
- 25 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Druckdifferenz über der Membran $0,5 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ bis $25 \cdot 10^5 \text{ Pa}$, bevorzugt $0,15 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ bis $5 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ beträgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff ein pharmazeutischer Wirkstoff, bevorzugt ein pharmazeutischer Wirkstoff für tiermedizinische Zwecke, besonders bevorzugt ein Antigen für eine Impfstoffformulierung ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff ausgewählt ist aus der Reihe umfassend ein Antigen, bevorzugt ein Virus oder einen Mikroorganismus, insbesondere ein Bakterium oder Parasit, oder ein Präparat, das eine Peptidkette enthält, bevorzugt ein Protein oder ein Glykoprotein, besonders bevorzugt ein Protein oder ein Glykoprotein, das aus einem Mikroorganismus erhalten wurde, ein synthetisches Peptid oder ein Protein oder Peptide, das durch gentechnische Manipulation hergestellt wurde.
- 10 12. Multiple Emulsion des Typs W/O/W erhältlich aus einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11.
13. Verwendung der Emulsion gemäß Anspruch 12 als Impfstoff für human- oder veterinärmedizinische Zwecke.

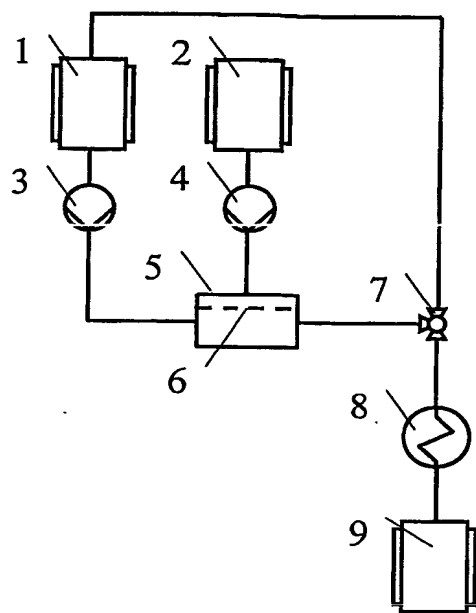


Fig. 1

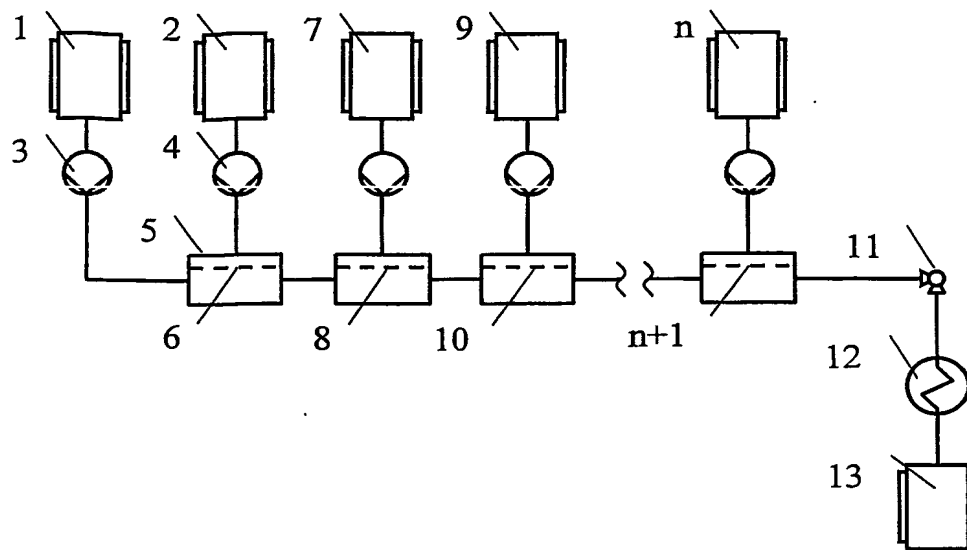


Fig. 2